この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

＊＊ 平成 27 年 4 月改訂（第 4 版）
＊ 平成 22 年 8 月改訂（第 3 版）

体外診断用医薬品

日本標準商品分類番号：87746
製造販売承認番号：22000AMX02113000

組織検査用腫瘍マーカーキット

EGFR pharmDx「ダコ」

重要な基本的注意事項

（１） 本添付文書に記載された使用方法及び使用目的以外の使用については，染色結果の信頼性を保証できないので，記載内容に従って使用すること。各施設独自の検体組織作製法や操作方法により本品を使用すると，EGFR 発現患者の選別・判定が正確に行うことができないおそれがある。
（２） 正確な検出結果を得るために，キットに含まれるタンパク分解酵素試薬による抗原賦活処理を必ず行うこと。他の種類のタンパク分解酵素試薬や他の方法による抗原賦活処理は，検出結果の再現性を損なう恐れがあるので，本添付文書に示した操作法を必ず守ること。
（３） 病理組織化学染色は，染色前の病理組織切片の取扱いや作製法が，染色結果に大きく影響する。病理組織切片の不適切な作製過程（固定が不十分である，或いは過度の固定等），凍結，融解，洗浄，乾燥，加熱，薄切，また，他の病理組織や試薬とのコンタミネーションは非特異反応や偽陽性・偽陰性結果の原因となるおそれがあるので，十分注意すること。そのため最適試薬の選択，検体組織の選別・固定・作製，検体組織スライドの作製から染色結果の判定に至るまで，熟練した者が行うこと。
（４） 標本作製の情報が無い検体や，やむをえず固定が適切でない検体を検査に使用する場合，その染色結果の解釈には十分注意し実施する必要がある。
（５） 染色結果の判定に際しては，適切な判定を行える十分な経験を持った判定者が実施すること。

全般的な注意

（１） 本製品は，体外診断用医薬品でありそれ以外の目的に使用しないこと。
（２） 検出結果に基づく臨床診断は，臨床症状や他の検査結果，最新の所見等と併せて，担当医師が総合的に判断すること。
（３） 使用する医療機器の添付文書や取扱説明書を良く読んでから使用すること。

形状・構造等（キットの構成） ＊＊

構成試薬名	成分	容量	
		K1492	K1494
タンパク分解酵素試薬	プロテイナーゼ K	8mL×1	11mL×2
ブロッキング試薬	過酸化水素水	8mL×1	11mL×2
一次抗体	抗ヒト EGFR（2-18C9）・マウスモノクローナル抗体	4mL×1	12mL×1
一次抗体陰性コントロール	IgG1・マウスモノクローナル抗体	4mL×1	11mL×1
ポリマー試薬	パーオキシダーゼ標識デキストラン 70 結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体	8mL×1	11mL×2
	パーオキシダーゼ標識デキストラン 500 結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体		
基質緩衝液	過酸化水素水（30%）	10mL×1	11mL×10
	イミダゾール緩衝液		
発色基質	3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド	1mL×1	3mL×2
濃縮洗浄液	トリス塩酸緩衝液	1L×1	1L×2
コントロールスライド	ホルマリン固定パラフィン包埋された次の細胞株 2 種類を貼付したスライド CAMA-1（EGFR タンパク発現量レベル：0） H T - 2 9（EGFR タンパク発現量レベル：2+）	5 枚×1	5 枚×2

使用目的

組織・細胞中の EGFR（上皮増殖因子受容体）タンパクの検出（悪性腫瘍診断の補助等）

検出原理

（１） 検出方法の概要
本品は，通常の病理検査室において通常診断に供与されているホルマリン固定パラフィン包埋した病理組織標本を用いて，対象病理組織の腫瘍細胞に EGFR タンパク発現が認められるか否かを判定する際に用いられる。その際の検出方法として，免疫組織化学的手法を用いている。
（２） 検出原理
検体中の EGFR タンパクに対し，特異的な一次抗体（抗ヒト EGFR（2-18C9）・マウスモノクローナル抗体）を反応させる。次にポリマー試薬を反応させることにより，ポリマー試薬中の抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体が一次抗体と反応する。更にデキストランの分子を介して，ポリマー試薬中のパーオキシダーゼが結びつき，＜抗原－一次抗体－抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体－パーオキシダーゼ＞複合体が形成される。これに基質溶液を反応させると，ポリマー試薬中のパーオキシダーゼの酵素反応によって，基質溶液中の 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド（DAB）が過酸化水素により酸化されて酸化 DAB を生じ，最終的には酸化的環形成を行って，オスミウム好性可視産物が生成され，抗原部位が褐色に染色される。染色により可視化された抗原部位を光学顕微鏡にて観察する。
（３） 特徴
①発色系の酵素として，最も一般的なパーオキシダーゼを使用している。
②酵素抗体反応を利用した 3 ステップの簡便な病理組織化学染色法である。

操作上の注意

（１） 病理組織は出来るだけ新鮮なものを使用すること。
（２） 検体組織は，「用法･用量（操作方法）　2. 検体の取り扱い」で指示された条件下，非緩衝ホルマリンなど，一般的に使用されているホルマリン固定液で固定したパラフィン包埋病理組織を使用すること。
（３） 3 日を越えるような長時間の固定，更にパラフィン包埋までの一連の操作により，ポリマー試薬の浸透力が低下し，反応性が低下する場合がある。免疫染色に適した病理組織標本の作製法に留意すること。
（４） 一般的に薄切前のパラフィン包埋病理組織は 15～25℃で長期間（2 年間程度）保存可能である。
（５） 検体組織を貼付するスライドは，抗原賦活処理により組織切片がスライドガラスから剥がれやすくなる恐れがあるので，シランコートされたスライドガラスを使用すること。アルブミンスライドの使用は避けること。
（６） 検体組織スライドは 20～25℃で保存し，作製後 4～6 週間以内に染色操作を行うこと。一般的にこの期間を越えた検体組織をスライドとして用いると，切片中の EGFR タンパクが変性し抗原性が劣化して，偽陰性染色を起こす場合があるので使用しないこと。[1]
（７） パラフィンの残留はバックグラウンド染色の原因となるので，完全に除去した後に染色操作を行うこと。そのため，脱パラフィンに用いるキシレン及びエタノールは，新しいものを使用すること。
（８） 検体組織スライドを脱パラフィンした後，すぐに染色操作に移れない場合は，洗浄液に浸し，2～8℃で保存し，少なくとも 16 時間以内には染色操作にはいること。一般的にこれ以上の長期にわたる保存は抗原性の劣化を引き起こすことがあると考えられているので使用しないこと。
（９） 染色操作は常温で行うこと。
（10） 反応の際には，検体組織が乾かないよう，例えば湿潤箱等を用いて，常に湿潤状態を保つこと。
（11） 染色中に沈殿を生じることがあっても，染色には影響を及ぼすことはないので，取り除く必要はない。
（12） 必ず陽性及び陰性対象のスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を進行させること。
（13） キットに含まれるコントロールスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を行い，染色操作が適切に行われていることを確認すること。
（14） 万一，染色操作を中断しなければならない場合は，一次抗体を反応させた後，検体組織スライドを緩衝液中に浸して保管すること。一般的には常温で 1 時間以内なら染色結果に影響はない。
（15） 人為的に生じる染色性の低下及び偏った染色を防ぐために，余分な水分を除去し，試薬を均一に広げるように注意すること。
（16） 検体組織に含まれる多量の内因性パーオキシダーゼにより，そのブロッキングが不十分な場合，非特異的な発色をおこすことがある。また，キット中の基質溶液調製時に余分なアジ化ナトリウムを添加する事により，発色基質（3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド）の発色反応が阻害される。[2][3]
（17） 水溶性封入剤で封入した場合，カバーガラスをかけた検体組織スライドを強い光に 1 週間以上さらすと，曇りが生じることがある。染色後のスライドは常温で遮光保存すること。

用法・用量（操作方法）

1. 必要な器具及び試薬

≪器具≫

・洗浄ビン　　・カバーガラス
・ろ紙　　　　・スライドガラス（シランコーティングスライド Code No.S3003 または S4103）
・タイマー
・染色ドーゼ　・乾燥器
・湿潤箱　　　・光学顕微鏡
・噴射ビン

≪試薬≫

■脱パラフィン用
（１） キシレン（JIS K8271）
（２） 100%，95%，80%，70%，50%，各エタノール

■その他
（１） トリス塩酸緩衝液 0.05mol／L　pH7.6
6.1g のトリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタンを約 50mL の精製水で溶かし，それに 1mol／L 塩酸 37mL を加えて精製水で最終的に 1L にする。（pH7.6±0.2;25℃）
（２） 精製水
（３） 対比染色液
ヘマトキシリン（Code No. S2020）
（４） 封入剤
非水溶性の永久標本用封入剤（例：エンテランニュー／マリノール）が望ましい。
（５） pH8.0 のアルカリ溶液
アンモニア水等

≪検体組織スライド≫

次の目的に最低 5 枚の検体組織スライドを作製することが望ましい。
① H&E 染色用（腫瘍細胞の確認）：1 枚
② EGFR タンパク検出用：1 枚
③ 一次抗体陰性コントロール用：1 枚
④ 予備：2 枚

≪コントロールスライド≫

染色操作の適切性の確認目的のために，キットの付属品のコントロールスライドを染色操作較正用標準スライドとする。

■陽性対照のコントロールスライド
陽性対照のコントロールスライドとして，検体組織スライドと同じ方法で作製され，あらかじめ EGFR タンパク陽性であることが確認されている病理組織標本の切片スライドを用意する。

■陰性対照のコントロールスライド
陰性対照のコントロールスライドとして，検体組織スライドと同じ方法で作製され，あらかじめ EGFR タンパク陰性であることが確認されている病理組織標本の切片スライドを用意する。

2. 検体の取扱い

≪パラフィン包埋切片の作製法≫

病理組織片は 2×2.5×0.5cm 程度以内の大きさとし，採取後ただちに，組織切片の 5～50 倍量のホルマリン固定液に浸す。この際，ホルマリン固定液に浸漬する時間は 24～48 時間以内が望ましい。特に 3 日以上固定した症例に関しては，染色結果に影響がある場合が考えられる。
病理組織ブロックは上記方法にて固定後，水洗いし，70vol%エタノールに浸す。それを順次高濃度となる系列のエタノールに浸して脱水し，更にキシレンに浸して脱アルコールした後パラフィン包埋する。包埋の際には温度が 60℃を超えないよう注意する。適切な方法で固定及び包埋した薄切前の病理組織ブロックは，常温での長期間保存が可能であり，EGFR タンパクの抗原性は良好に保持される。

≪標本の作製≫

検体組織スライド，陽性対照のコントロールスライド，陰性対照のコントロールスライドは同時に作製すること。パラフィン包埋ブロックはミクロトームで 4μm に薄切し，スライドガラスに貼り付け，40±3℃の恒温槽内で十分に乾燥させる。組織切片作製後は抗原性保持のため 20～25℃で保管し，遅くとも 4～6 週間以内に染色を実施すること。

≪脱パラフィン≫

染色操作の直前に脱パラフィンを行う。検体組織スライドを以下の様に順に各液に浸す。
キシレン（100vol%）5 分→キシレン（100vol%）5 分→キシレン（100vol%）5 分→エタノール（100vol%）3 分→エタノール（100vol%）3 分→エタノール（95vol%）3 分→エタノール（80vol%）3 分→エタノール（70vol%）3 分→エタノール（50vol%）3 分→精製水 3 分→精製水 3 分

3. 試薬の調製法，安定性

試薬は使用前に常温にもどすこと。
試薬は最適結果が得られるように至適濃度に調製されているので，使用の際は以下（１）～（２）以外の希釈をしないこと。
（１） 基質溶液の調製法
基質緩衝液 1mL に対して，発色基質 1 滴（25～30μL）を加えて混合する。
調製後の基質溶液は，なるべく早く使用する。
（２） 洗浄液の調製法
濃縮洗浄液を精製水で 10 倍希釈し，洗浄液とする。
調製後の洗浄液は 2～8℃及び常温で 8 日間安定である。
保存中，洗浄液が混濁した場合は使用せず廃棄する。
（３） その他の試薬
その他の試薬はそのまま用いる。

4. 染色操作

≪染色方法≫

必ず本キットの較正標準であるコントロールスライド，陽性及び陰性対照のスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を進行させること。

■用手法
（１） 検体組織スライドの過剰水分を払い落とし，検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で十分注意しながら拭き取る。
（２） タンパク分解酵素試薬 3 滴（約 100μL）で検体組織を覆い，常温で 5 分間反応させる。次に，流水にて約 3 分間静かにすすいだ後，過剰水分を払い落とし，検体組織スライドを精製水中に 5 分間浸漬する。
（３） 検体組織スライドの過剰水分を払い落とし，検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で十分注意しながら拭き取る。
（４） ブロッキング試薬 3 滴（約 100μL）で検体組織を覆い，常温で 5 分間反応させる。次に，流水にて約 3 分間静かにすすいだ後，過剰水分を払い落とし，検体組織スライドを洗浄液中に 5 分間浸漬する。
（５） 検体組織スライドの過剰水分を払い落とし，検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で十分注意しながら拭き取る。
（６） 一次抗体 3 滴（約 100μL）で検体組織を覆い，常温で 30 分間反応させた後，噴射ビンに入れた洗浄液で静かにすすいで，洗浄液中に 5 分間浸漬する。この洗浄液を新しいものに交換し，更に 5 分間浸漬する。一次抗体陰性コントロール用検体組織スライドには，一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロール 3 滴（約 100μL）で検体組織を覆い，以下同様に操作を行う。
（７） 検体組織スライドの過剰水分を払い落とし，検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で十分注意しながら拭き取る。
（８） ポリマー試薬 3 滴（約 100μL）で検体組織を覆い，常温で 30 分間反応させた後，噴射ビンに入れた洗浄液で静かにすすいで，洗浄液中に 5 分間浸漬する。この洗浄液を新しいものに交換し，更に 5 分間浸漬する。
（９） 検体組織スライドの過剰水分を払い落とし，検体組織の周囲の水分をキムワイプ等で十分注意しながら拭き取る。
（10） 基質溶液 100μL で検体組織を覆い，常温で 10 分間反応させた後，噴射ビンに入れた精製水或いは洗浄液で静かにすすぎ，洗浄液中に 5 分間浸漬する。
（11） 対比染色液に 1～5 分間浸漬し，5 分間流水で洗浄して対比染色する。
（12） 必要に応じてアンモニア水などの pH8.0 のアルカリ溶液に浸漬し，色出し操作をする。

■自動染色装置による操作法

（１） 検体組織スライド，タンパク分解酵素試薬，ブロッキング試薬，一次抗体，一次抗体陰性コントロール，ポリマー試薬，基質溶液，精製水，洗浄液を機器の所定位置に設置する。

（２） それぞれの反応時間を下記のように設定する。

① ブロッキング試薬：5 分
② 精製水：3 分
③ 洗浄液：5 分
④ タンパク分解酵素試薬：5 分
⑤ 精製水：5 分 2 回
⑥ 一次抗体：30 分
⑥' 一次抗体陰性コントロール：30 分
⑦ 洗浄液：5 分 2 回
⑧ ポリマー試薬：30 分
⑨ 洗浄液：5 分 2 回
⑩ 基質溶液：10 分
⑪ 洗浄液：5 分 2 回
⑫ 対比染色液：1～5 分
⑬ 流水にて 5 分間静かに洗浄する。

（３） 自動染色装置の操作法に従って操作する。

（４） 必要に応じてアンモニア水 pH8.0 のアルカリ溶液に浸漬し，色出し操作をする。

≪脱水・透徹・封入≫

（１） 使用する封入剤の種類により，必要に応じて検体組織スライドを以下のように順に各液に浸漬する。
流水水洗 1 分→精製水 1 分→エタノール（50vol%）3 分→エタノール（70vol%）3 分→エタノール（80vol%）3 分→エタノール（95vol%）3 分→エタノール（100vol%）3 分→エタノール（100vol%）3 分→エタノール（100vol%）3 分→キシレン（100vol%）3 分→キシレン（100vol%）3 分→キシレン（100vol%）3 分

（２） 封入剤で封入し，カバーガラスをかける。

検出結果の判定法及び判定に係る注意事項

①検出結果の判定法

検体組織中に EGFR タンパクが検出される場合，陽性シグナルは一次抗体が反応した標的細胞の細胞膜及び細胞質に認められ，茶褐色を呈する。

検体組織中の EGFR タンパクの判定は，以下の基準に従って実施する。

■判定対象検体組織スライドの染色性

腫瘍細胞が EGFR タンパクを発現していれば，腫瘍細胞の膜に一致して，連続性あるいは不連続性の褐色の反応性が認められる。この染色態度を後述判定基準により以下の手順で判定すること。

（１） 本品中のコントロールスライドの特異染色性及び染色強度を観察し，染色手順及び構成試薬の性能を確認する。

（２） 陽性所見を示す検体組織スライドを選択し，EGFR タンパク染色像を確認する。

（３） まず，光学顕微鏡の 4 倍対物レンズを使用して，検体組織内の腫瘍細胞の EGFR タンパク陽性染色像を観察する。

（４） 次に対物レンズを 10 倍或いは 20 倍に切り替え，陽性所見が腫瘍細胞の細胞膜か細胞質に局在するかを検索する。細胞質のみに陽性所見が見られるものは陰性と判定する。

＜判定基準＞

判定	基準
EGFR 陰性	全ての腫瘍細胞において細胞膜への染色が認められない。
EGFR 陽性	染色態度が，連続性或いは不連続性に関わらず，腫瘍細胞の細胞膜に染色が認められる。

また，各染色を実施した際，下記に示す順序で染色結果の妥当性を決定すること。

■本品中のコントロールスライドの染色性

キットの構成試薬のコントロールスライドを較正用標準スライドとし，必ず同時に染色して，操作方法が適切に行われたかを判断すること。

HT-29：細胞膜に中等度の発現レベルの反応性を示す。

HT-29 細胞において，褐色の反応性が認められない場合，試薬の性能や操作方法が適切でなかった可能性がある。

CAMA-1：何ら免疫反応性は見られない。

CAMA-1 細胞において，褐色の反応性が認められる場合，この染色は非特異反応であり，これらの染色標本は診断に適さない。

■陽性対照のコントロールスライドの染色性

腫瘍細胞の膜に褐色の免疫反応が認められること。

■陰性対照のコントロールスライドの染色性

本品の構成試薬の成分が交差反応により起こしうる反応性を除外するために，EGFR タンパクが発現していないと確認されている病理組織標本で陰性であることを確認する。この切片で褐色の反応性が認められる場合，この染色は非特異反応であり，これらの染色組織標本は診断に適さない。

■一次抗体陰性コントロール試薬で染色した検体組織スライドの染色性

免疫反応性がないことを確認する。結合組織・壊死組織・白血球や赤血球に褐色の反応性が認められる場合，検体組織スライドの不良が考えられるため留意すること。

②判定上の注意

（１） 一個の腫瘍細胞中においても組織および腫瘍のタイプにより様々な染色強度を示す染色パターンが観察される。特に不均一な染色パターンの場合，一つの腫瘍中にさまざまな染色強度のエリアが認められるので留意すること。

（２） 必ず各コントロールスライドの染色結果と比較して，染色結果を判定すること。

（３） 一般的にタンパクや基質反応生成物の非免疫的結合により，偽陽性結果が観察される場合がある。偽陽性結果は赤血球による偽パーオキシダーゼ反応やサイトクローム C による内因性パーオキシダーゼ反応によっても起きることがある。[4]

（４） 使用する対比染色液の性能や反応時間の長さによって，核染色の度合いが薄かったり，逆に暗青色に染まることがある。過剰，或いは不完全な核染色は，染色結果の適切な判定を損なう怖れがあるので注意すること。

（５） 細胞質の陽性染色は一般的に観察されるため，判定は腫瘍細胞膜の陽性染色態度より判定すること。また細胞質染色により膜染色の判別が困難で結果判定が正しく出来ない場合は再試験を行うこと。

（６） 検体組織の壊死部分は，抗体が非特異的に結合しやすく非特異的染色の原因となり易いので，陰性コントロールスライドと比較し，十分注意して判定すること。

（７） 陽性コントロールの染色強度が弱すぎたり強すぎたりする場合は，偽陰性染色や偽陽性染色が考えられるため再試験を行うこと。

（８） B 型肝炎ウィルスに感染したヒトの組織や HBs 抗原を含む組織はパーオキシダーゼで非特異的染色を示すので注意して判定すること。[5]

（９） 間質にあるコラーゲンは，ホルマリン固定後疎水性となって抗体と結合し易くなること，陰性に帯電しているため陽性に帯電している抗体と結合し易いことなどにより，非特異的染色の原因となり易いので，陰性コントロールスライドと比較し，十分注意して判定すること。

（10） 顆粒球の一部，及びマクロファージなどは細胞膜表面に Fc レセプターを有するため，抗体の Fc 部分と結合し，抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがあるので，陰性コントロールスライドと比較し，十分注意して判定すること。

臨床的意義

EGFR の過剰発現はシグナル伝達系を混乱させ，細胞の腫瘍化・悪性化を惹起するだけではなく，さまざまな悪性腫瘍で過剰発現が確認されており，腎癌では 50～90%，非小細胞肺癌では 40～80%，前立腺癌では 40～80%，頭頸部癌では 36～100%，卵巣癌では 35～70%，胃癌では 33～74%，大腸癌では 25～77%，乳癌では 14～91%で過剰発現が見られるとの報告がある。[6]

EGFR の過剰発現を呈する悪性腫瘍は予後不良を示し，またホルモン療法，化学療法，放射線療法において耐性を示すことなどが報告されている。[7-10]

このような状況下，本タンパクを標的とした薬剤の開発が進められ，現在までに，EGFR の細胞外領域に直接作用し，リガンド結合の阻害，受容体の細胞内への取り込みを誘導する抗体治療薬，そして EGFR の細胞内領域での ATP の結合を阻害し，細胞内でのシグナルの伝達を妨害する低分子チロシンキナーゼ阻害剤などさまざまな新規治療薬が開発され，国内・海外共に多くの臨床試験が実施されている。[11-16]

本品の国内における臨床性能試験としては，2006 年から 2007 年にかけて，国内二施設において，無差別に選択した結腸・直腸がん症例合計 201 症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックについて，受託施設にて研究実績のある染色方法と本品での染色結果を比較したところ，それぞれ 92.8%，98.0%と言う高い一致率を示し，本品が EGFR タンパク発現検出キットとして有用であることが示唆された。

性能

「用法・用量（操作方法）」欄の操作方法により，感度，正確性及び再現性の各試験を行い，「検出結果の判定法及び判定に係る注意事項」の判定基準に従って，EGFR タンパク過剰発現を判定した場合，下記の規格に適合する。

■ 感度試験

（１） 正常ヒト扁平上皮を管理用検体とした場合，基底層における EGFR タンパク発現は，自社判定基準の 2.0 以上を示し，表層においては，1.0 以下を示す。

（２） EGFR タンパク発現陽性ヒト培養細胞 HT-29 を管理用検体とした場合，EGFR タンパク発現は，自社判定基準の 2.5±0.5 の範囲内にある。

（３） EGFR タンパク発現陰性培養細胞 CAMA-1 を管理用検体とした場合，EGFR タンパク発現は自社判定基準の 0 を示す。

■ 正確性試験

（１） EGFR タンパク発現陽性ヒト培養細胞 HT-29 を管理用検体とした場合，EGFR タンパク発現は，自社判定基準の 2.5±0.5 の範囲内にある。また，本品の一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロールを使用した場合，自社判定基準の 0 を示す。

（２） EGFR タンパク発現陰性培養細胞 CAMA-1 を管理検体とした場合，EGFR タンパク発現は自社判定基準の 0 を示す。また，本品の一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロールを使用した場合も自社判定基準の 0 を示す。

■ 同時再現性試験

EGFR タンパク発現陽性ヒト培養細胞 HT-29 及び EGFR タンパク発現陰性培養細胞 CAMA-1 から作製した標本スライド各 3 枚を同時に染色すると，HT-29 培養細胞標本における EGFR タンパク発現はいずれも自社判定基準の 2.5±0.5 の範囲内であり，CAMA-1 培養細胞標本における EGFR タンパク発現はいずれも自社判定基準の 0 を示す。

（管理検体と EGFR タンパク発現自社判定スコア）

- 正常ヒト扁平上皮
  判定スコア　基底層　2.0 以上　表層　1.0 以上
- ヒト細胞株 HT-29
  1 細胞辺りの EGFR レセプター数　228.08ng／mg protein
  判定スコア：2.5±0.5
- ヒト細胞株　CAMA-1
  1 細胞辺りの EGFR レセプター数　35,000 以下
  判定スコア：0

使用上又は取扱い上の注意

①取扱い上の注意

（１） 検体組織には，HBV，HIV など，感染のおそれのあるものもあるので，取扱いには十分注意すること。

（２） 検査にあたっては感染の危険を避けるため，使い捨て手袋を着用すること。

（３） 試薬を口で吸い上げないこと。

（４） 試薬が皮膚や粘膜に直接接触することを避けること。万一触れた場合は，多量の水で洗い流すこと。

（５） 製品中の容器・付属品等は他の目的に転用しないこと。

（６） 発色基質である 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド（DAB）は，変異原性が認められているので，取扱いに際しては非金属製のピンセット等の保護具を使用し，目や皮膚への接触を避けること。万一，皮膚に触れたり，目に入った場合は，流水で 15 分間以上洗い流し，直ちに医師の診察を受けること。

（７） キットの試薬中，ブロッキング試薬，一次抗体，一次抗体陰性コントロールはアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため，容器の落下・衝撃による破損がないように丁寧に取り扱うこと。

②使用上の注意

（１） キットは凍結を避け，貯法に従い保存すること。凍結させた試薬は，品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないこと。

（２） 試薬はなるべく早く使用し，有効期限を過ぎた試薬，コントロールスライドは使用しないこと。

（３） 試薬は直接日光に当てないこと。特に発色基質や基質溶液は，強い光にさらさないこと。

（４） 試薬は微生物に汚染されないよう注意すること。

（５） 異なるロットの試薬や他社品の試薬を混ぜて使用しないこと。

（６） 同一ロットの試薬であっても試薬を注ぎ足さないこと。

（７） 洗浄液やタンパク分解酵素試薬等，施設での作製が可能な試薬や他から購入した試薬を使用して本操作を行うことは，染色結果の信頼性を担保出来ないため，必ずキット中の試薬を使用すること。

（８） 使用後は，キャップを堅く締めておくこと。

③廃棄上の注意　＊＊

（１） 検体組織に接触した器具・試薬及び試薬容器等は感染の危険性があるものとし，オートクレーブで 121℃20 分間滅菌処理するか，または 1vol%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晩処理すること。

（２） 使用後の容器を廃棄する場合には，廃棄物処理及び清掃に関する法律等の規定に従って処理すること。

（３） キットの試薬中，ブロッキング試薬，一次抗体，一次抗体陰性コントロールはアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため，廃棄の際は多量の水で希釈して廃棄すること。

貯蔵方法，有効期間

貯蔵方法：2～8℃で保存

有効期間：1 年

包装

	Code No.	包装単位
EGFR pharmDx「ダコ」	K1492	35 テスト
EGFR pharmDx「ダコ」（自動染色装置用）	K1494	50 テスト

主要文献

（１） Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2／neu antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. Cancer Res 1994; 54:2771

（２） Fahimi HD, Gray BA, Herzog VK. Cytochemical localization of catalase and peroxidase in sinusoidal cells of rat liver. Lab invest 1976; 34:192-201

（３） Li CY et,al. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. J Histochem Cytochem 1987; 35:1457-1460

（４） Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Special report: quality control in immunohistochemistry. Amer J Clin Pathol 1989; 92:836

（５） Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: A possible source of error in immunohistochemistry. Amer J Clin Pathol 1980; 73:626

（６） Normanno N, Maiello MR, Luca AD. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? J Cell Physiol 2002; 194:13-19

（７） Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, et al. Co-expression　of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients. Int J Cancer 2000; 89:484-487

（８） Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer 2001; 37 Suppl 4:S9-15

（９） Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst 1998; 90:824-828

（10） Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, etrogenreceptor-positive breast cancer. Ann N Y Acad Sci 2002; 963:104-115

（11） Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. Invest New Drugs 1999; 17:259-269

（12） Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. Eur J Cancer 2001; 37 Suppl 4:S16-22

（13） Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. Cancer 2002; 94:1593-1611

（14） Woodlburn JR. The epidermal growth factor receptor and tis inhibition in cancer therapy. Pharmacol Ther 1999; 82:241-250

（15） Raymond E, faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. Drugs 2000; 60 Suppl1:15-23

（16） Waksal HW. Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer. Cancer Metastasis Rev 1999; 18:427-436

問い合わせ先 **

ダコ・ジャパン株式会社　カスタマーサポート
〒108-0023
東京都港区芝浦四丁目 16 番 36 号住友芝浦ビル
TEL：03-5232-9968

製造販売元の名称及び住所 **

ダコ・ジャパン株式会社
〒108-0023
東京都港区芝浦四丁目 16 番 36 号住友芝浦ビル
TEL：03-5232-9970　　FAX：03-5232-9969